

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-000164

(43)Date of publication of application : 07.01.1997

(51)Int.Cl.

A23J 3/34  
A23J 3/04  
C12P 21/06  
//C12P 21/06  
C12R 1:69 )  
C12P 21/06  
C12R 1:38 )  
C12P 21/06  
C12R 1:465 )

(21)Application number : 07-156317

(71)Applicant : ASAHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 22.06.1995

(72)Inventor : FUJII MIKIO  
NAGAOKA YOSHIKO

## (54) PRODUCTION OF HYDROLYZED PROTEIN

(57)Abstract:

PURPOSE: To readily and precisely hydrolyze an edible protein in two-stage reaction by combining a hydrolyzing process using specific two kinds of protease formulations.

CONSTITUTION: At first, an edible protein, partially digested material of an edible protein and a peptide derived from food protein are digested with an enzyme formulation containing at least 5 kinds of proteases and peptidases derived from *Aspergillus oryzae* and selected from those respectively having molecular weights of 23kD, 27kD, 31kD, 32kD, 35kD, 38kD, 42kD, 47kD, 53kD and 100kD. Next, the resultant digested material is further digested with an enzyme formulation containing a prolylendopeptidase, a prolidase and a prolinase derived from a single microorganism. As a microorganism simultaneously producing these 3 kinds of enzymes, e.g. *Pseudomonas.sp* KU-22 strain (FERM P-13788) and *Streptomyces xanthophaeus* HA-36 strain (FERM P-13827) are exemplified.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 22.11.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 08.04.2003

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-164

(43)公開日 平成9年(1997)1月7日

(51)Int.Cl.*	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 2 3 J	3/34		A 2 3 J	3/34
	3/04			3/04
C 1 2 P	21/06		C 1 2 P	21/06
// (C 1 2 P	21/06			
C 1 2 R	1:69)			

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平7-158317

(22)出願日 平成7年(1995)6月22日

(71)出願人 000000033

旭化成工業株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

(72)発明者 藤井 幹夫

静岡県富士市駿島2番地の1 旭化成工業株式会社内

(72)発明者 長岡 由子

静岡県富士市駿島2番地の1 旭化成工業株式会社内

(54)【発明の名称】 加水分解蛋白質の製造方法

(57)【要約】

【目的】 蛋白質を酵素により高度に加水分解する方法を開発する。

【構成】 蛋白質をアスペルギルス オリゼに由来し、少なくとも5種のプロテアーゼおよびペプチダーゼを含む酵素製剤で消化後、単一微生物由来のプロリルエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼを含む酵素製剤で消化することを特徴とする加水分解蛋白質の製造方法。

【効果】 従来、3工程以上の酵素反応を必要とした蛋白質の高度加水分解が、本発明により2工程の酵素反応で実施できる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 食用蛋白質、食品蛋白質の部分消化物、および食品蛋白質由来のペプチドをアスペルギルス・オリゼに由来し、かつ分子量がそれぞれ約23kD、約27kD、約31kD、約32kD、約35kD、約38kD、約42kD、約47kD、約53kD、および約100kDの中から選ばれる少なくとも5種のプロテアーゼおよびペプチダーゼを含む酵素製剤で消化し、その後単一微生物由来のプロリルエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよびアロリナーゼを含有する酵素製剤で消化することを特徴とする加水分解蛋白質の製造方法。

【請求項2】 5種のプロテアーゼおよびペプチダーゼの分子量が約23kD、約31kD、約35kD、約38kD、約53kDである請求項1に記載の加水分解蛋白質の製造方法。

【請求項3】 単一微生物がシュードモナス (*Pseudomonas*) 属細菌由来である請求項1乃至2記載の加水分解蛋白質の製造方法。

【請求項4】 単一微生物がストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属由来である請求項1乃至2記載の加水分解蛋白質の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、加水分解蛋白質の製造方法に関する。加水分解蛋白質は調味料、食品の品質改良剤等に幅広く利用されている。

## 【0002】

【従来の技術】 蛋白質の加水分解は通常塩酸を添加して高温、高圧処理する事により行われている。しかしながらこれらの食品を取り扱う業界では、消費者の天然物嗜好の拡大に伴い、化学薬品である塩酸を使用しない方法が望まれるようになってきた。塩酸加水分解法に代わる方法として、蛋白質分解酵素を用いる加水分解方法が考えられるが、酵素のコストが塩酸に比べて高価であること、また塩酸を用いて加水分解した場合と同程度に加水分解率を高めることは困難であったことから実用化には困難を伴う場合が多かった。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の課題は、特定の蛋白質分解酵素による加水分解工程を組み合わせたことにより、蛋白質を高度に加水分解する方法を開発することである。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 酵素による加水分解で蛋白質の加水分解率が低い原因の1つとして、蛋白質中のイミノ酸残基の存在があげられる。すなわち、環状 $\alpha$ -イミノ酸であるプロリンは他のアミノ酸とは異なる立体構造をしており、蛋白質またはペプチド中のイミノ酸残基のイミノ基やカルボキシル基が関与するペプチド結合は通常の蛋白質分解酵素による加水分解を受けにくい。

蛋白質を通常の蛋白質分解酵素で加水分解すると、プロリン残基の部分が生ペプチドまたはトリペプチドの状態にまで加水分解された時点で反応が終了してしまうことになる。

【0005】 プロリン残基を含むペプチドを加水分解する酵素としては、オリゴペプチド中に存在するプロリン残基のC-末端側のペプチド結合を切断するプロリルエンドペプチダーゼや、Pro-Xの構造を有するジペプチドを加水分解するアロリナーゼ、X-Proの構造を有するジペプチドを加水分解するプロリダーゼ等が知られている。本発明者らは通常の蛋白質分解酵素による加水分解工程と、単一微生物由来のプロリルエンドペプチダーゼ、アロリダーゼおよびアロリナーゼを含有する酵素剤を用いた加水分解工程を組み合わせることにより蛋白質を高度に加水分解できることを見出し、平成5年日本国特許出願第266467号にその内容を開示した。しかしながらこの方法では、エンド型酵素による加水分解工程、プロリルエンドペプチダーゼ、プロリダーゼ、およびアロリナーゼによる加水分解工程およびエキソ型酵素による加水分解工程と3段階の工程が必要である。

【0006】 実用上、操作をさらに簡便するため、本発明者らは鋭意検討を行った。その結果、アスペルギルス・オリゼに由来し、かつ分子量がそれぞれ約23kD、約27kD、約31kD、約32kD、約35kD、約38kD、約42kD、約47kD、約53kD、および約100kDの中から選ばれる少なくとも5種のプロテアーゼおよびペプチダーゼを含む酵素製剤による加水分解工程を実施した後、単一の微生物に由来するプロリルエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよびアロリナーゼを含有する酵素剤を用いた加水分解工程を実施するという2段階の反応により、容易に蛋白質を高度に加水分解できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0007】 本発明の方法の最初の工程には、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) 由来で、分子量がそれぞれ約23kD、約27kD、約31kD、約32kD、約35kD、約38kD、約42kD、約47kD、約53kD、および約100kDの中から選ばれる少なくとも5種のプロテアーゼおよびペプチダーゼを含む酵素製剤を用いる。詳細には、上記の5種のプロテアーゼおよびペプチダーゼの分子量はそれぞれ約23kD、約31kD、約35kD、約38kD、約53kDである。この様な多数のプロテアーゼおよびペプチダーゼを同時に含む酵素製剤で蛋白質を加水分解することにより、プロリン等の環状イミノ酸を多く含む蛋白質が、後段の工程であるプロリルエンドペプチダーゼ、アロリダーゼおよびアロリナーゼを含有する酵素製剤を用いた加水分解工程において、これら3種の酵素が充分に作用できる程度に低分子化される。このような低分子化は、原料蛋白質を特異性の異なる複

数のプロテアーゼおよびペプチダーゼで処理することによっても達成できるが、異なる複数のプロテアーゼ製剤を同時にまたは連続して使用するよりも、複数のプロテアーゼおよびペプチダーゼを同時に含む単一のプロテアーゼ製剤を用いる方が有利である。

【0008】本発明の最初の工程に用いることのできるアスペルギルス・オリゼ由来の酵素製剤として、分子量がそれぞれ約23kD、約27kD、約31kD、約32kD、約35kD、約38kD、約42kD、約47kD、約53kD、および約100kDの中から選ばれた少なくとも5種のプロテアーゼおよびペプチダーゼを含むノボ・ノルディスク社 (NOVO NORDISK A/S、デンマーク) のフレバーザイム (Flavourzyme) があげられる。このような酵素製剤により環状イミノ酸を多く含む蛋白質の前処理を行った場合には、単にこの工程での加水分解率が高いのみならず、プロリルエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼによる加水分解工程において分解率の増加分がより高くなることが見出される。

【0009】本発明の後段の工程には、単一微生物由来のプロリルエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼを含有する酵素製剤が用いられる。プロリルエンドペプチダーゼ (別名ポストプロリンクリービング酵素またはプロリン特異的エンドペプチダーゼ、EC 3. 4. 21. 26) は、オリゴペプチド中に存在するプロリン残基のC-末端側のペプチド結合を加水分解する酵素である。プロリルエンドペプチダーゼを産生する微生物としては、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) 属細菌、キサントモナス (*Xanthomonas*) 属細菌、アルカリゲネス (*Alcaligenes*) 属細菌、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属の放線菌が報告されている。これら微生物以外にもプロリルエンドペプチダーゼを産生する微生物を新たにスクリーニングすることにより新規プロリルエンドペプチダーゼを取得することも可能である。プロリルエンドペプチダーゼを産生する微生物は、その培養液をカルボベンゾキシアラニルアラニルプロリルパラニトロアニド (以下Z-Ala-Ala-Pro-pNAと略す) 等に作用させ、黄色のパラニトロアニンを遊離させること等を指標に土壌等より分離することができる。

【0010】プロリダーゼ (別名プロリンジペプチダーゼ、EC 3. 4. 13. 9) はX-Proの構造のジペプチドを加水分解するが、X-Pro-Yの構造のトリペプチドのX-Pro結合を加水分解する場合もある。プロリダーゼを産生する微生物としては、エシェリシア・コリ (*Escherichia coli*)、ラクトバチルス・ラクタス (*Lactococcus lactis*)、ストレプトコッカス・クレモリス (*Streptococcus cremoris*)、ノイロ

スポラ (*Neurospora*) 属糸状菌、サーマス・アクアティカス (*Thermus aquaticus*)、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属細菌等が報告されている。これら微生物以外にもプロリダーゼを産生する微生物を新たにスクリーニングすることにより新規プロリダーゼを取得することも可能である。プロリダーゼを産生する微生物は、その培養液をグリシルプロリン (以下Gly-Proと略す) 等に作用させた後に生じる遊離プロリンを指標に土壌等より分離することができる。

【0011】プロリナーゼ (別名プロリルジペプチダーゼ、EC 3. 4. 13. 8) はPro-Xの構造のジペプチドを加水分解する酵素である。プロリナーゼを産生する微生物としては、ストレプトコッカス・クレモリス (*Streptococcus cremoris*)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) 等が報告されている。これら微生物以外にもプロリナーゼを産生する微生物を新たにスクリーニングすることにより新規プロリナーゼを取得することも可能である。プロリナーゼを産生する微生物は、その培養液をプロリルグリシン (以下Pro-Glyと略す) 等に作用させた後に生じる遊離プロリンを指標に土壌等より分離することができる。

【0012】プロリルエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼを同時に産生する微生物として、シュードモナス・エスピー (*Pseudomonas* sp.) KU-22株およびストレプトマイセス・キサントファエウス (*Streptomyces xanthophaeus*) HA-36株があげられる。シュードモナス・エスピー KU-22株は好気性の桿菌であり、YM培地 (ポリペプトン0.5%、酵母エキス0.3%、マルトエキス0.3%、グルコース1.0%、寒天1.0%、pH7.2) 上30℃で培養した場合に淡黄色、湿潤で光沢のあるコロニーを形成する。細胞のサイズは0.4μm×1.6μmの直桿菌であり、グラム染色陰性、運動性あり、極性鞭毛、ウレアーゼテスト陽性、カタラーゼテスト陽性、オキシゲナーゼテスト陽性、クエン酸利用テスト陽性、澱粉加水分解テスト陰性、グルコース酸化能 (OF-テスト) 陽性、キノ系はQ-9、黄色色素産生なし、水溶性色素産生なし、蛍光色素産生なし、アルギニン加水分解酵素テスト陰性、フォグス・アロスカウエルテスト (VPテスト) 陰性、硝酸還元テスト陰性、メチルレッドテスト陰性、D-グルコース、D-マニトール、D-マンノース、エタノール、スクロースより好気条件下に酸を生成しない、37℃、40℃、42℃で生育し、45℃で生育しない、5%食塩存在下に生育し、10%食塩存在下に生育しない、好気条件下にD-グルコース、D-マニトール、D-マンノース、酢酸を資化し、スクロースを

資化しない。尚、本菌株は工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-13788として寄託されている。

【0013】シュドモナス・エスピー KU-22の培養液より酵素剤を得る方法は公知の方法をそのまゝ、または一部修正して用いることができる。これらペプチダーゼの生産に適する培地としては、グルコース、酵母エキス、ポリペプトン、CSL、食塩等を含有する培地が有効である。培養温度30℃で2日間程度の培養により著量のプロリルエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼが培地中に生産される。酵素の収量を増大させるために、超音波による菌体破壊または浸透圧ショック等を行うことも有効である。菌体または菌体残渣を除去した後、たとえば硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等を行うことによりそれぞれの酵素が精製できるが、加水分解反応もしくは加水分解物に悪影響を与える因子が混在せず、かつ食品衛生上の問題が無ければ、該酵素の粗精製品または培養液からの抽出物をそのまま反応に利用することも可能である。

【0014】ストレプトマイセス・キアントファエウス HA-36株はスターチ、無機塩基培地で30℃で培養することにより、よく分岐した菌糸からstraight to flexurusの菌糸を伸長し、成熟した菌糸の先に10〜50個の楕円〜円筒形の胞子からなる胞子鎖を形成する。胞子嚢は無く、胞子の大きさは0.7〜1.0×1.0〜1.5μmで、胞子表面はsmoothであり、鞭毛は認められない。本菌株の細胞壁の糖成分には特に特徴は認められず、細胞壁成分のジアミノピメルン酸はL型である。尚、本菌株は工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-13827として寄託されている。

【0015】ストレプトマイセス・キアントファエウス HA-36株の培養液より酵素剤を得る方法は、公知の方法をそのまゝ、または一部修正して用いることができる。ペプチダーゼの生産に適する培地としては、グルコース、澱粉、乾燥酵母、食塩を含有する培地が有効である。培養温度30℃で4日間程度培養することにより著量のプロリルエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼが培地中に生産される。菌体および不溶性成分を除去した後、たとえば硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等を行うことによりそれぞれの酵素が精製できるが、加水分解反応もしくは加水分解物に悪影響を与える因子が混在せず、かつ食品衛生上の問題が無ければ該酵素の粗精製品または培養液からの抽出物をそのまま反応に利用することも可能である。尚、既知のプロリルエンドペプチダーゼは通常高分子の基質に対しては全く作用しないが、本微生物が生産するプロリルエンドペプチダーゼは高分子基質であるカゼインに対して

も加水分解性を示すことが特徴である。

【0016】本発明に用いられる上述の酵素製剤はいずれも、これら酵素を同時に生産する微生物の培養物や細胞破砕液をそのまま使用するか、またはこれらより酵素を粗精製したものをを用いることができる。反応は通常の酵素反応と同じく酵素が失活しない程度の一定の温度で攪拌条件で行うことが望ましい。シュドモナス・エスピー KU-22株およびストレプトマイセス・キアントファエウス HA-36株の生産するプロリルエンドペプチダーゼおよびプロリダーゼは、ヒドロキシプロリンを含むペプチドには作用しにくいことから、コラーゲンやゼラチン等ヒドロキシプロリンを多量に含む蛋白質を加水分解する場合には、Pro-Hypに対する特異性が高いプロリダーゼを用いた加水分解工程を行うことが好ましい。このプロリダーゼによる反応は、プロリルエンドペプチダーゼ、プロリダーゼおよびプロリナーゼを含む酵素剤による反応と同時に実施しても、別々に実施してもよい。尚、Pro-Hypに対する特異性が高いプロリダーゼは、オーレオバクテリウム・エステラロマトイカム(Aureobacterium aesteraromaticum)IFO3752の培養液より生産される。この微生物は財団法人発酵研究所が保存する微生物であり、同所に依頼することにより誰でもこれらの菌株の分譲を受けることができる。

【0017】Pro-Hypに対する特異性が高いプロリダーゼは、オーレオバクテリウム・エステラロマトイカム IFO 3752をグルコース、ペプトン、酵母エキス、コンスタンツィーリカー(CSL)等を含む培地に接種し、28〜30℃で1〜3日好気培養することにより生産される。該ペプチダーゼは培養上清中にも多少蓄積するため、これを濃縮してもよいが、多量の酵素を取得する場合には菌体を遠心分離等により集め、超音波処理、浸透圧ショック処理、リゾチーム処理や界面活性剤処理を行い、菌体内に存在する該ペプチダーゼを抽出することが望ましい。菌体の抽出液より公知の常法、例えば硫酸またはアセトンによる分画、疎水クロマトグラフ、イオン交換クロマトグラフ、ゲル濾過クロマトグラフ等を用いることにより、Pro-Hypのジペプチドを加水分解する酵素を精製することができる。この酵素を加水分解反応に用いる場合には必ずしも酵素を精製することは必要ではなく、加水分解反応もしくは加水分解物に悪影響を与える因子が混在せず、かつ食品衛生上の問題が無ければ該酵素の粗精製品または培養液からの抽出物をそのまま反応に利用することも可能である。酵素反応が終了した後、脱色、濃縮、殺菌等の処理を行い、目的の加水分解蛋白質が調製される。以下実施例により本発明をさらに詳細に記述するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0018】

【実施例】

【0019】

【実施例1】

## 1) KU-22粗酵素液の調製

シュドモナス・エスピー (*Pseudomonas* sp.) KU-22株をグルコース0.5%、ポリバpton1%、酵母エキス0.5%、CSL2%、塩化ナトリウム0.3%、リン酸水素ナトリウム0.2%、硫酸マグネシウム・7水和物0.1%よりなる培地100ml (pH7.2) を含む500ml容坂口フラスコ6本に移殖し、30℃で48時間振盪培養を行った。培養液より遠心分離により(8,000×g、20分)菌体を集め、10mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0) (以下緩衝液Aと称する) で2回洗浄後、菌体を超音波処理することにより粉砕した。その後遠心分離(8,000×g、20分)により細胞残渣を除去することにより細胞抽出液5mlを得た。この無細胞抽出液を水中で冷却攪拌しながら90%飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、30分間水中で攪拌させた後4℃で一晩放置した。沈澱物を遠心分離(8,000×g、20分)により回収し、氷冷した10mlの緩衝液Aに溶解した。続いて緩衝液Aに対して透析を行い、粗酵素液を得た(以下KU-22粗酵素液と称する)。

【0020】プロリルエンドペプチダーゼ活性の測定は以下の条件にて行った。即ち、1mM Z-Ala-Ala-Ile-Pro-pNA (40%メタノールに溶解) 200μlに50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0) 800μlを加え、37℃で5分間予備保温した後、酵素サンプル(緩衝液Aで適宜希釈したもの) 200μlを添加して30分間反応させた。1Mの酢酸ナトリウム緩衝液 (pH3.5) を400μl加えて反応を停止させた。蒸質に1M酢酸緩衝液 (pH3.5) をあらかじめ加えた後で酵素サンプルを添加したものをブランクとして410nmの吸光度を測定し、反応より遊離したパラニトリアニリンの量を求めた。尚、プロリルエンドペプチダーゼ1単位は37℃の反応で1分間に1μmolのパラニトリアニリン相当量を遊離させるのに必要な酵素量と定義した。KU-22粗酵素液のプロリルエンドペプチダーゼの活性は1.1単位/mlであった。

【0021】プロリダーゼ活性の測定は以下の条件で行った。即ち、5mM Gly-Proを含む緩衝液A 200μlに酵素サンプル(緩衝液Aで適宜希釈したもの) 100μlを加え、37℃で30分間反応させた。1Mの酢酸ナトリウム緩衝液 (pH8.0) を700μl添加して反応を停止させた後、10%のニヒドリンを含む95%エタノール溶液100μlを加えて、70℃、10分間加熱・冷却し、440nmの吸光度を測定した。一方、酵素サンプル添加前に酢酸緩衝液を添加したものを同様にニヒドリン反応させたものにつき440nmの吸光度を測定し、これをブランクとした。また、5mMのGly-Pro溶液と、5mMグリシンお

よび5mMプロリンを含む溶液を適宜混合し、この混合液200μlに蒸留水100μlを加え、上記と同様にニヒドリン反応を行ったものを各種準備し、これらの440nmの吸光度を測定して標準曲線を作成した。標準曲線より遊離プロリンの濃度を求め、プロリダーゼにより生じたプロリン量を算出した。尚、プロリダーゼ1単位は37℃の反応で1分間に1μmolのプロリンを遊離させるのに必要な酵素量と定義した。KU-22粗酵素液のプロリダーゼ活性は5.7単位/mlであった。

【0022】プロリナーゼ活性の測定は以下の条件で行った。即ち、5mM Pro-Glyを含む緩衝液A 200μlに酵素サンプル(緩衝液Aで適宜希釈したもの) 100μlを加え、1Mの酢酸ナトリウム緩衝液 (pH8.0) を700μl添加して反応を停止させた後、10%のニヒドリンを含む95%エタノール溶液100μlを加えて、70℃、10分間加熱・冷却し、440nmの吸光度を測定した。一方、酵素サンプル添加前に酢酸緩衝液を添加したものを同様にニヒドリン反応させたものにつき440nmの吸光度を測定し、これをブランクとした。また、5mMのPro-Gly溶液と、5mMグリシンおよび5mMプロリンを含む溶液を適宜混合し、この混合液200μlに蒸留水100μlを加え、上記と同様にニヒドリン反応を行ったものを各種準備し、これらの440nmの吸光度を測定して標準曲線を作成した。標準曲線より遊離プロリンの濃度を求め、プロリナーゼにより生じたプロリン量を算出した。尚、プロリナーゼ1単位は37℃の反応で1分間に1μmolのプロリンを遊離させるのに必要な酵素量と定義した。KU-22粗酵素液のプロリナーゼ活性は4.9単位/mlであった。

## 【0023】2) HA-36粗酵素液の調製

ストレプトマイセス・キサントファエウス (*Streptomyces xanthophaeus*) HA-36株を1%グルコース、1%可溶性澱粉、2%乾燥酵母、0.3%食塩よりなる培地100ml (pH7.2) を含む500ml容坂口フラスコ20本に移殖し、30℃で4日間振盪培養を行った。培養液を遠心分離(8,000×g、20分)することにより菌体を除き、この液を水中で冷却攪拌しながら80%飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、30分間水中で攪拌させた後4℃で一晩放置した。沈澱物を遠心分離(8,000×g、20分)により回収し、氷冷した緩衝液A 50mlに溶解させた。続いて緩衝液Aに対して透析を行い、粗酵素液を得た(以下HA-36粗酵素液と称する)。プロリルエンドペプチダーゼ活性は0.73単位/ml、プロリダーゼ活性は0.45単位/ml、プロリナーゼ活性は1.1単位/mlであった。

## 【0024】3) 蛋白質の調製と前段処理

5リットル容高圧オートクレーブに牛骨3600gと水



720 gを仕込み、密封後に昇温を開始した。オートクレーブの内圧が0.5 kg/cm<sup>2</sup>に達したらオートクレーブ内のエア抜きを実施し、再度密封してオートクレーブの内圧が3 kg/cm<sup>2</sup>になるまで加熱し、1時間煮出しを行った。冷却後、オートクレーブ内の液を5リットル容分液ロートに移し、上層の油を除いて下層の牛骨抽出液2400 gを回収し、これをエバポレーターで濃縮してT-N7.7%、F-N0.39%の濃縮液450 gを得た。本濃縮液210 gに水を320 gを加えて希釈後、1.6%水酸化ナトリウム溶液を加えてpHを7.0に調整した。この溶液にノボ・ノルディスク社製フレーバーザイムを7.3 g添加し、50℃で48時間反応させた。反応終了液を85℃で30分加熱することにより酵素を失活させた。本フレーバーザイム処理液はT-N=2.95%、F-N=1.24%であり、加水分解率は42.0%と算出された。

#### 【0025】4) 粗酵素液による加水分解

上記3)で得られたフレーバーザイム処理液のpHを8.0に調整した後、これを3本の試験管A、B、Cにそれぞれ15 mlずつ分注した。試験管Aには蒸留水1.5 mlを、試験管Bには上記1)で得られたKU-22粗酵素液1.5 mlを、試験管Cには上記2)で得られたHA-36粗酵素液1.5 mlを添加して37℃で24時間反応させた。反応終了液のケルゲール窒素(T-N)およびホルモール窒素(F-N)の分析を行った結果(表1)、サンプルBおよびCの加水分解率は、サンプルAの加水分解率に比べて高くなっており、サンプルBではサンプルAに比べて約15%も高い値を示した。

#### 【0026】

##### 【表1】

サンプル	F-N (%)	T-N (%)	分解率 (%)	【増加分%】
A	1.15	2.67	43.1	[-]
B	1.56	2.69	58.0	[14.9]
C	1.38	2.66	51.9	[8.8]
D	0.62	2.66	23.3	[-]
E	0.87	2.68	32.5	[9.2]
F	0.77	2.67	28.8	[5.5]
G	1.61	2.47	65.2	[23.1]

#### 【0027】

【比較例1】上記実施例1の3)で得られた牛骨抽出濃縮液210 gに水を320 gを加えて希釈後、1.6%水酸化ナトリウム溶液を加えてpHを7.0に調整した。この溶液に天野製薬社社製プロテアーゼMを7.3 g添加し、50℃で48時間反応させた。反応終了液を85℃で30分加熱することにより酵素を失活させた。本プロテアーゼM処理液はT-N=2.96%、F-N=0.67%であり、加水分解率は22.6%と算出された。このプロテアーゼM処理液のpHを8.0に調整した後、これを3本の試験管D、E、Fにそれぞれ15 mlずつ分注した。試験管Dには蒸留水1.5 mlを、試験管Eには実施例1の1)で得られたKU-22粗酵素液1.5 mlを、試験管Fには実施例1の2)で得られたHA-36粗酵素液1.5 mlを添加して37℃で24時間反応させた。反応終了液のケルゲール窒素(T-N)およびホルモール窒素(F-N)の分析を行った結果(表1)、サンプルEおよびFではコントロールであるサンプルDに比べて加水分解率は高くなっていったものの、その増加率は5~10%程度であった。

#### 【0028】

【実施例2】オーレオバクテリウム・エステラロマトイカム(*Aureobacterium esteraromaticum*) IFO 3752を、グルコース0.5%、ポリペプトン2%、酵母エキス0.5%、CSL2%、塩化ナトリウム0.3%、リン酸水素二カリウム0.2%、硫酸マグネシウム・7水和物0.1%よりなる培地1リットルに接種し、28℃で3日間振盪培養した。培養液より集菌し、緩衝液Aで2回洗浄後、10 mMのEDTAを含む同緩衝液200 mlに懸濁させた。これにリゾチームを終濃度0.5 mg/mlとなるように添加し、37℃で1時間保温した。これを超音波処理し、15、000 gで10分間遠心分離して上清150 mlを回収し、粗酵素抽出液とした。酵素活性の測定は以下のように行った。5 mMのPro-Hypを含む200 μlの緩衝液Aに酵素液(緩衝液Aで適宜希釈したもの)を100 μl添加し、37℃で30分間反応させた。反応液に1 Mの酢酸ナトリウム緩衝液(pH 2.8)700 μlを添加して反応を停止させ、10%ニンヒドリンを含む95%エタノール溶液100 μlを加えて70℃で10分間ニンヒドリン反応を行い、プロリンおよびヒドロキシプロリンに由来する440 nmの

吸光度を測定した。標準液として、基質ペプチドとその想定加水分解物(Pro-Hyp、プロリンおよびヒドロキシプロリン)とを適宜混合したものにつき同様のニンヒドリン反応を行って標準曲線を作成し、これをもとにプロリン、ヒドロキシプロリンの遊離量を求めた。

尚、酵素1単位は37℃、1分間の反応で1 $\mu$ molのPro-Hypを加水分解する酵素量と定義した。本粗酵素液の活性は2.5単位/mlであった。

【0029】実施例1で得られたフレーバーザイム反応液のpHを実施例1と同様に8.0に調整し、その15mlに上記の粗酵素抽出液1.5mlと実施例1で得られたKU-22粗酵素液1.5mlとを添加して50℃で48時間加水分解させた(反応液G)。反応液Gにつ

きケルダール法による全窒素(T-N)の分析とホルモール滴定法によるホルモール窒素(F-N)の分析を行い、両者の比より加水分解率を計算した。その結果、反応液Dは約65%もの加水分解率を示し、後段処理における増分加水分解率は23%であった(表1)。

#### 【0030】

【発明の効果】蛋白質の加水分解を複数のプロテアーゼおよびペプチダーゼを同時に含む特定の酵素製剤と、プロリルエンドペプチダーゼ、アロリダーゼおよびアロリナーゼを含む酵素製剤による処理とを組み合わせることにより高い加水分解率が得られることから、食品、特に調味料用途の蛋白質の加水分解に効果的に利用できる。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>

識別記号

序内整理番号

F I

技術表示箇所

(C 1 2 P 21/06

C 1 2 R 1:38)

(C 1 2 P 21/06

C 1 2 R 1:465)